

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PENELOPY COSTA E SANTOS**

**Isolamento e caracterização de levedura produtora de carotenoides, com potencial  
biotecnológico**

**PATOS DE MINAS – MG  
NOVEMBRO DE 2024**

**PENELOPY COSTA E SANTOS**

**Isolamento e caracterização de levedura produtora de carotenoides, com potencial biotecnológico**

“Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia”

Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte

**PATOS DE MINAS – MG**

**NOVEMBRO DE 2024**

**PENELOPY COSTA E SANTOS**

**Isolamento e caracterização de levedura produtora de carotenoides, com potencial biotecnológico**

“Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de bacharel em Biotecnologia”  
Prof. Dr. Gilvan Caetano Duarte

Banca Examinadora:

---

Gilvan Caetano Duarte - Presidente

---

Cristine Chaves Barreto - Membro

---

Marcos de Souza Gomes - Membro

**PATOS DE MINAS - MG**

**NOVEMBRO DE 2024**

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer a Deus e ao Universo, que com toda sua energia magnífica me proporcionaram todas as coisas que me trouxeram até aqui.

Agradeço aos meus pais, Maria José Costa Santos e Clauter dos Santos, que sempre batalharam por mim, me dando toda estrutura para que eu pudesse ter as melhores oportunidades que essa vida poderia me oferecer, sempre estiveram presentes durante toda minha caminhada e foram pacientes para que eu pudesse concluir essa etapa com êxito.

Agradeço também ao meu professor e orientador Gilvan Caetano Duarte, que me acompanhou durante a realização do presente trabalho, me auxiliou nas etapas laboratoriais, na escrita e conclusão deste estudo. Meu muito obrigado também aos professores Marcos Gomes, Cristine Chaves, e Terezinha Teixeira, que fizeram parte do trabalho, auxiliando na realização dos experimentos; juntamente aos técnicos do laboratório da UFU *campus* Patos de Minas, que sempre estiveram à disposição para auxiliar durante os experimentos. Serei eternamente grata a todo corpo docente da universidade que durante todos esses anos me proporcionaram conhecimento para me tornar uma profissional da biotecnologia apta a seguir o caminho da ciência, pesquisa e desenvolvimento.

Com muito amor e carinho, agradeço aos meus amigos que estiveram comigo durante todo o período da faculdade, pois tornaram os dias leves, cheios de alegria e me proporcionaram o suporte necessário para que esta jornada fosse concluída. Em especial, agradeço ao Miguel Gonçalves de Almeida, por ter se tornado meu companheiro de vida, por me auxiliar, me fazer sorrir, e estar presente em todos os momentos durante a jornada da graduação.

Finalmente, o meu agradecimento à UFU *campus* Patos de Minas, aos colegas de classe, Atlética Gnomada, Diretório Acadêmico, LiNAbiotec, e todas as pessoas que fizeram parte da jornada acadêmica, e que compartilharam momentos importantes junto a mim.

Obrigada! Vocês têm minha gratidão eterna, e fizeram parte dos melhores anos da minha vida!

## RESUMO

É premente à sociedade contemporânea, a busca de microrganismos que funcionam como “biofábricas” de produtos biotecnológicos. Dentre estes microrganismos, as leveduras se destacam pela capacidade de produzir diferentes compostos quando cultivadas, os quais possuem interessantes propriedades biotecnológicas e comerciais. Este trabalho visou a exploração das características de um fungo, com estrutura celular leveduriforme, isolado após assepsia de uma folha coletada nas imediações do prédio dos Laboratórios da UFU, *campus* Patos de Minas. A levedura foi cultivada em diferentes fontes de carbono e, após centrifugação, obteve-se os sobrenadantes “extratos brutos” que foram submetidos à dosagem de atividades enzimáticas para xilanases, pectinases, amilases e endoglicanases. A partir dos precipitados celulares, obteve-se extratos de pigmentos que foram caracterizados quanto ao potencial antibacteriano, antioxidante e presença de compostos fenólicos. Paralelamente, a levedura isolada foi identificada em nível taxonômico. Como resultado, os extratos brutos revelaram reduzidos valores de atividade enzimática para holocelulases e amilases, com destaque para a fonte de carbono caldo de batata, que apresentou atividade xilanase correspondente a 0,15 UI.mL<sup>-1</sup>. Os precipitados celulares obtidos das fontes de carbono, glicose e sacarose, revelaram potencial na produção de pigmentos carotenoides. Estes extratos de pigmentos não apresentaram atividade antibacteriana contra as cepas de bactérias testadas. Para os testes de efeito antioxidante, os resultados se mostraram positivos, quando os extratos de pigmentos foram testados nas concentrações de 4,0 x 10<sup>4</sup> mg.mL<sup>-1</sup>. Não houve diferença estatisticamente significativa para a presença de fenólicos totais nos extratos de pigmentos em glicose e sacarose, respectivamente. Finalmente, a identificação taxômica do material genético extraído, revelou que a levedura isolada pertence à espécie *Rhodotorula mucilaginosa*. A levedura endofítica *R. mucilaginosa* constitui exemplo de fungo com potencial biotecnológico, principalmente em nível de produção de pigmentos carotenoides com propriedade antioxidante. Palavras-chave: Levedura, xilanases, carotenoides, atividade antibacteriana, atividade antioxidante, *Rhodotorula mucilaginosa*.

## ABSTRACT

It is an urgent need in contemporary society to seek microorganisms that function as "biofactories" of biotechnological products. Among these microorganisms, yeasts stand out for their ability to produce different compounds when cultivated, which have interesting biotechnological and commercial properties. This work aimed to explore the characteristics of a yeast-like fungus isolated after asepsis of a leaf collected near the UFU Laboratories building, Patos de Minas campus. The yeast was cultivated in different carbon sources, and after centrifugation, the supernatants "crude extracts" were obtained and subjected to enzymatic activity assays for xylanases, pectinases, amylases, and endoglucanases. From the cellular precipitates, pigment extracts were obtained and characterized for their antibacterial, antioxidant, and phenolic compound potentials. Concurrently, the isolated yeast was identified at the taxonomic level. As a result, the crude extracts revealed reduced enzymatic activity values for holocellulases and amylases, with emphasis on the potato broth carbon source, which showed xylanase activity corresponding to 0.15 UI.mL<sup>-1</sup>. The cellular precipitates obtained from the carbon sources glucose and sucrose revealed potential in the production of carotenoid pigments. These pigment extracts did not show antibacterial activity against the tested bacterial strains. For the antioxidant effect tests, the results were positive when the pigment extracts were tested at concentrations of 4.0 x 10<sup>4</sup> mg.mL<sup>-1</sup>. There was no statistically significant difference in the presence of total phenolics in the pigment extracts in glucose and sucrose, respectively. Finally, the taxonomic identification of the extracted genetic material revealed that the isolated yeast belongs to the species *Rhodotorula mucilaginosa*. The endophytic yeast *R. mucilaginosa* constitutes an example of a fungus with biotechnological potential, mainly in terms of carotenoid pigment production with antioxidant properties.

Keywords: Yeast, xylanases, carotenoids, antibacterial activity, antioxidant activity, *Rhodotorula mucilaginosa*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fragmento da estrutura de uma cadeia de hemicelulose representando os sítios de ataque de xilanase ( <b>Figura A</b> ), e pectinase ( <b>Figura B</b> ) .....	13
Figura 2- Exemplos de carotenos encontrados na natureza.....	14
Figura 3- Rota metabólica de biossíntese de carotenoides.....	15
Figura 4- Na <b>Figura 4 A</b> ) é apresentada a placa de Petri contendo os microrganismos que sobreviveram e cresceram, após a assepsia da folha coletada. Em <b>B</b> ) é possível a visualização da colônia rosada da levedura se destacando dentre as demais colônias.....	25
Figura 5- Superfície de uma placa de Petri contendo meio BDA: a levedura isolada foi mantida em crescimento para posterior análise em laboratório.....	26
Figura 6- Visualização microscópica da levedura, utilizando a objetiva de 100x.....	26
Figura 7- <b>A</b> ) Cultivo submerso utilizando diferentes substratos (caldo de batata, sacarose, glicose, e maltose, respectivamente, todos a 1%): o cultivo foi realizado em meio líquido em volume de 50 ml, a 28°C por 6 dias. <b>B</b> ) Erlenmeyers no <i>shaker</i> , para agitação e crescimento celular.....	27
Figura 8- Erlenmeyers após 6 dias de cultivo.....	28
Figura 9- Quantificação das atividades enzimáticas dos extratos brutos obtidos posteriormente ao cultivo da levedura em diferentes fontes de carbono; as atividades enzimáticas foram realizadas a 50°C e tempo de incubação de 30 minutos.....	29
Figura 10- Quantificação dos açúcares redutores liberados posteriormente ao cultivo da levedura em diferentes fontes de carbono; as amostras foram adicionadas em solução de DNS e submetidas à fervura por 10 minutos; as leituras das atividades foram realizadas em 540 nm; e os valores de açúcar redutor total, em mg/mL.....	30
Figura 11- Células contendo expressão de pigmento rosado/alaranjado anteriormente à extração, apresentadas na imagem <b>A</b> ) e <b>B</b> ); e imagem <b>C</b> ) com pigmento após extração.....	31
Figura 12- Placas de Petri após 24 horas de incubação a 35°, sendo a imagem <b>A</b> ) contendo a bactéria <i>S. aureus</i> , e a imagem <b>B</b> ) contendo a bactéria <i>E.coli</i> . O extrato do pigmento não demonstrou efeito na inibição do crescimento para as bactérias testadas .....	32
Figura 13- Tubos de ensaio contendo os pigmentos após 60 minutos de reação. Em <b>A</b> ), é possível observar os reagentes juntamente ao pigmento, ambos concentrados. Em <b>B</b> ), a solução apresenta-se diluída para melhor visualização.....	33

Figura 14- Atividade antioxidante presente nas amostras contendo pigmento nas diferentes concentrações em mg.mL <sup>-1</sup> .....	34
Figura 15- Atividade antioxidante total presente nas amostras do pigmento nas diferentes concentrações em mg.mL <sup>-1</sup> , utilizando o método ABTS .....	35
Figura 16- Tubos de ensaio após 2,0 horas de reação. Na esquerda, é possível visualizar, os tubos de ensaio contendo o pigmento produzido na presença do substrato D-glicose, já na direita os tubos contendo o pigmento produzido na presença do substrato sacarose, ambos contendo o reagente Folin Ciocalteu.....	36
Figura 17- Quantificação de compostos fenólicos totais presentes nas amostras dos extratos do pigmento nas diferentes concentrações em mg.GAE/100g.....	36
Figura 18- Imagem resultante do material genético da levedura após eletroforese. O amplicon foi visualizado em gel de agarose a 1%, a 75 V por 30 minutos, utilizando o marcador (M) 1kb; sendo a canaleta 1 o M, a 2 o controle positivo, a 3 o controle negativo, a 4 o DNA puro da levedura, e a 5 o DNA diluído a 10% .....	38
Figura 19- Resultado da análise do alinhamento do material genético da levedura.....	38
Figura 20- Resultado do alinhamento das sequencias de RNA ribossomal, utilizando a ferramenta BLAST de análises do NCBI.....	39

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	11
2.1 Leveduras .....	11
2.2 Carotenoides .....	14
2.3 Antimicrobianos .....	16
2.4 Antioxidantes .....	17
3 OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivos gerais .....	18
3.2 Objetivos específicos .....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1 Isolamento da levedura e repique .....	18
4.2 Manutenção da cultura .....	19
4.3 Visualização microscópica da levedura .....	19
4.4 Cultivo para produção de pigmento .....	20
4.5 Ensaios para dosagem de amilase, pectinase, CMCase e xilanase .....	20
4.6 Dosagem de açúcar redutor total .....	21
4.7 Extração do pigmento .....	21
4.8 Teste para verificação do efeito antibacteriano .....	21
4.9 Determinação da atividade antioxidante – método DPPH .....	22
4.10 Determinação da atividade antioxidante – método ABTS.....	23
4.11 Determinação dos fenólicos totais.....	23
4.12 Análise estatística .....	24
4.13 Extração de DNA para identificação .....	24
4.14 Amplificação das regiões espaçadoras transcritas internas do rDNA 18S.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
5.1 Caracterização macro e micro morfológico do isolado fúngico e a produção de pigmentos.....	25
5.2 Caracterização dos extratos quanto ao perfil enzimático e dosagem de açúcares redutores totais .....	28
5.3 Extração de pigmento .....	31
5.4 Teste para verificação do efeito antibacteriano do pigmento pós – extração .....	32

5.5 Resultado dos testes antioxidantes (DPPH e ABTS) e de compostos fenólicos .....	33
5.6 Resultado da análise do material genético extraído .....	37
6 CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS .....	40

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por soluções sustentáveis na indústria mundial, vem sendo um tema amplamente trabalhado pela ciência, devido à constante necessidade de melhorias para a obtenção de maior qualidade e aumento da produção nas mais diversas áreas de consumo humano. A sociedade passa por constantes avanços, os quais a biotecnologia vem para agregar técnicas de manipulação de organismos vivos, a fim de proporcionar novos produtos de fontes limpas, não poluentes, renováveis, de baixo custo, e que visam trazer inúmeros benefícios tanto para quem produz, quanto para o consumidor final.

Os fungos, são organismos que devido a sua característica de estarem presentes em todos os ambientes do planeta, proporcionam grande acesso ao ser humano, que estuda e utiliza das inúmeras propriedades que podem nos proporcionar. Uma gama de metabólitos de origem fúngica são encontradas nas diversas áreas de consumo, como na indústria farmacêutica, alimentícia, de bebidas, têxtil, de papel, entre outras aplicações em que vemos estes diferentes organismos participando do processo industrial.

Dentre estes produtos de origem fúngica podemos destacar as enzimas, principalmente a holocelulases produzidas em expressiva quantidade por fungos, em especial, pelo grupo das leveduras. O Cerrado Brasileiro conta com uma enorme variedade etnobotânica, incluindo espécies frutíferas que se destacam pelo seu potencial econômico, industrial e biotecnológico. Tendo em vista tal cenário, destacam-se os fungos hospedeiros e endofíticos, que podem ser encontrados nas folhas, caule, brotos, flores e frutos de plantas existentes nesse bioma. O termo endofítico refere-se aos microrganismos que habitam no espaço inter e intracelular das células vegetais de forma mutualística, desempenhando papéis importantes para a manutenção da saúde das plantas, na produção de reguladores de crescimento vegetal e também protegendo os tecidos vegetais contra herbívoros.

Os pigmentos carotenoides, são substâncias presentes em diversos alimentos, sejam eles de forma natural, como em cenouras, mamão, beterrabas, laranjas e tomates, ou de maneira adicionada, na forma de corantes alimentícios, presentes em alimentos processados. Tais pigmentos são capazes de proporcionar uma vasta gama de benefícios ao nosso organismo quando consumidos, através de substâncias conhecidas como antioxidantes. Os antioxidantes são capazes de neutralizar os radicais livres presentes nas células do corpo humano, o que os torna alvo de diversas pesquisas acerca de suas propriedades. Estes pigmentos podem também ser extraídos de microrganismos como as leveduras, que os produzem naturalmente em suas células, e que quando extraídos podem ser utilizados também como fonte de carotenoides.

Tais pigmentos carotenoides, são responsáveis também por produzir metabólitos conhecidos como antimicrobianos, que são capazes de inibir o crescimento de microrganismos, como fungos e bactérias. Essa capacidade de sintetizar substâncias inibidoras de certos microrganismos atrai a atenção de diversos cientistas, que buscam sempre um novo composto capaz de atuar como bactericida, visto que as bactérias estão se tornando resistentes aos antibióticos já existentes, e são necessárias novas fontes de metabólitos que sejam potencialmente promissoras para solucionar tal questão.

Para este trabalho, foi realizado um estudo utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, que tem por característica marcante, a produção de pigmento no interior das suas células. Assim, foi realizado um cultivo em meio líquido, utilizando diferentes substratos, para avaliação das diferentes características de crescimento, bem como da produção de enzimas e do pigmento. Estes foram extraídos e testados a fim de avaliar suas propriedades, para maior compreensão dos metabólitos que este microrganismo é capaz de produzir, o que permitirá um estudo das possíveis aplicabilidades futuras para esta levedura.

Dentre as metodologias testadas para a caracterização da levedura e de seu potencial biotecnológico, foram avaliadas diferentes atividades dirigidas a degradação de material lignocelulósico, atividade antibacteriana, verificação das propriedades antioxidantes possivelmente expressas no pigmento produzido, e também a extração do material genético para identificação taxonômica a nível de espécie.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Leveduras**

Na natureza, encontramos uma imensidão de espécies de seres vivos. Dentre estes, existem o grupo das leveduras, pertencentes ao grande grupo dos fungos, as quais são microrganismos unicelulares e tipicamente saprófitos, sendo ubíquos em todos os ecossistemas do mundo. As células leveduriformes podem se apresentar, dependendo da condição de cultivo, como alongadas, apiculadas, botuliformes, baciliformes, cilíndricas, elipsoidais, globosas, subglobosas, ovoidais, ogivais, e triangulares. Evidências mostram que as condições nutricionais do meio de cultivo em que se encontram, são capazes de afetar o tipo de morfologia da colônia que está sendo expressa (Yarrow, 2011). Estes microrganismos também apresentam diferentes texturas, como viscosa, fluida, mucoide e membranosa. Como resultado da produção

de polissacarídeos, pode-se associar ao crescimento mucoide. Já a formação de filamentos, é resultado de um crescimento membranoso (Yarrow, 2011).

Uma característica muito importante, a qual foi trabalhada no presente estudo, é a cor. Leveduras expressam colorações distintas como vermelho, alaranjado e amarelo. A presença dessas tonalidades indica que estes microrganismos possuem pigmentos carotenoides no interior de suas células (Yarrow, 2011), os quais apresentam grande interesse biotecnológico e científico, por suas inúmeras propriedades.

Outro papel muito importante desempenhado pelos fungos, é o de degradação do material lignocelulósico. Diversos microrganismos têm a capacidade de degradar a celulose em função de transformá-la em energia e fonte de carbono. Porém, existem alguns grupos de fungos que evoluíram e adquiriram a capacidade de degradar também a lignina, que está presente no interior da parede celular das plantas (Sánchez, 2008). Tal degradação ocorre no exterior celular dos fungos, devido a associação de enzimas, estas pertencentes aos sistemas hidrolítico e lignolítico, que são capazes de degradar os polissacarídeos e a lignina, sendo estas fontes de energia e carbono para os organismos fúngicos (Sánchez, 2008). As xilanases e pectinases são enzimas que atuam degradando, principalmente açúcares redutores, sendo as pectinases importantes para a despolimerização de substâncias pécticas (Oliveira, 2019).

Várias leveduras já foram descritas por sua capacidade de produção de enzimas hidrolíticas como xilanases, pectinases, amilases e hemicelulases, e seu potencial biotecnológico atrai a atenção de pesquisadores por todo o mundo, devido à vasta gama de aplicações como na indústria de papel, têxtil, agroindústria, farmacêutica, alimentícia e de biocombustíveis (Lara, 2013).

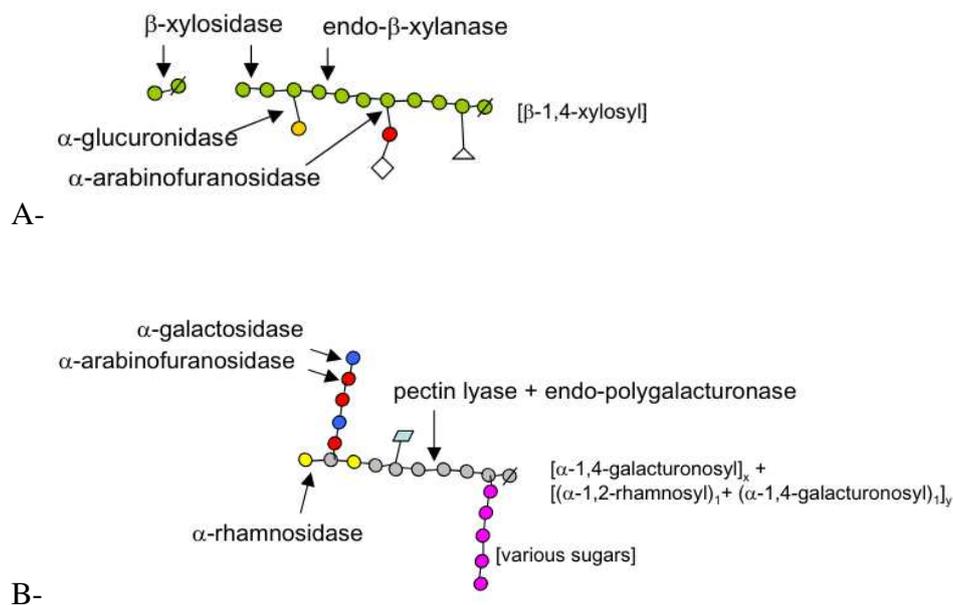
Dentre as enzimas que são produzidas pelos fungos, as xilanases apresentam grande importância por catalisarem a hidrólise da xilana. A xilana, é o constituinte mais numeroso da hemicelulose, e essa se encontra entre a lignina e a celulose, fazendo a conexão entre ambas. A xilana possui alto grau de polimerização e ramificação, e devido à complexidade de sua natureza química, são necessários um conjunto de enzimas que atuam de maneira sinérgica, chamado de sistema enzimático xilanolítico, capazes de promover sua desconstrução e degradação. Tal conjunto de enzimas, conhecido como xilanases apresentam, de maneira geral atividade máxima entre pH 4,0 e 6,5 e temperatura entre 40°C e 80°C. A aplicação de tais xilanases despertam interesse industrial e biotecnológico, sendo amplamente utilizadas para produção de alimentos e bebidas, ração animal, cuidados pessoais, processamento têxtil, branqueamento na indústria do papel, produção de biocombustíveis, clarificação de sucos ou

cervejas, branqueamento da polpa para sucos, extração de óleos vegetais, recuperação de fibras têxteis e biomodificação de resíduos agrícolas (Moura et al., 2021).

Já a pectina representa um polímero complexo, altamente ramificado, representando um polissacarídeo amplamente utilizado como geleificante e estabilizante na indústria de alimentos. Para o mercado mundial, as enzimas apresentam alto valor comercial, e a indústria alimentícia lidera o ranking de consumo de tais substâncias, em especial pelo uso das pectinases, responsáveis pela degradação e desconstrução de substâncias pécnicas, sendo aplicadas na extração e clarificação de sucos, maceração de extratos vegetais, dentre outras funções que tornam as pectinases tão importantes no meio industrial (Santos, 2007).

Conforme ilustrado na **Figura 1 A e B**, podemos visualizar uma pequena fração da estrutura simplificada dos polissacarídeos xilana e pectina, destacando os sítios de ataque das enzimas xilanases e pectinases, respectivamente, que promovem a hidrólise de ligações químicas específicas.

**Figura 1:** Fragmento da estrutura de uma cadeia de hemicelulose representando os sítios de ataque de xilanase (**Figura A**), e pectinase (**Figura B**).



Fonte: Turner et al, 2007

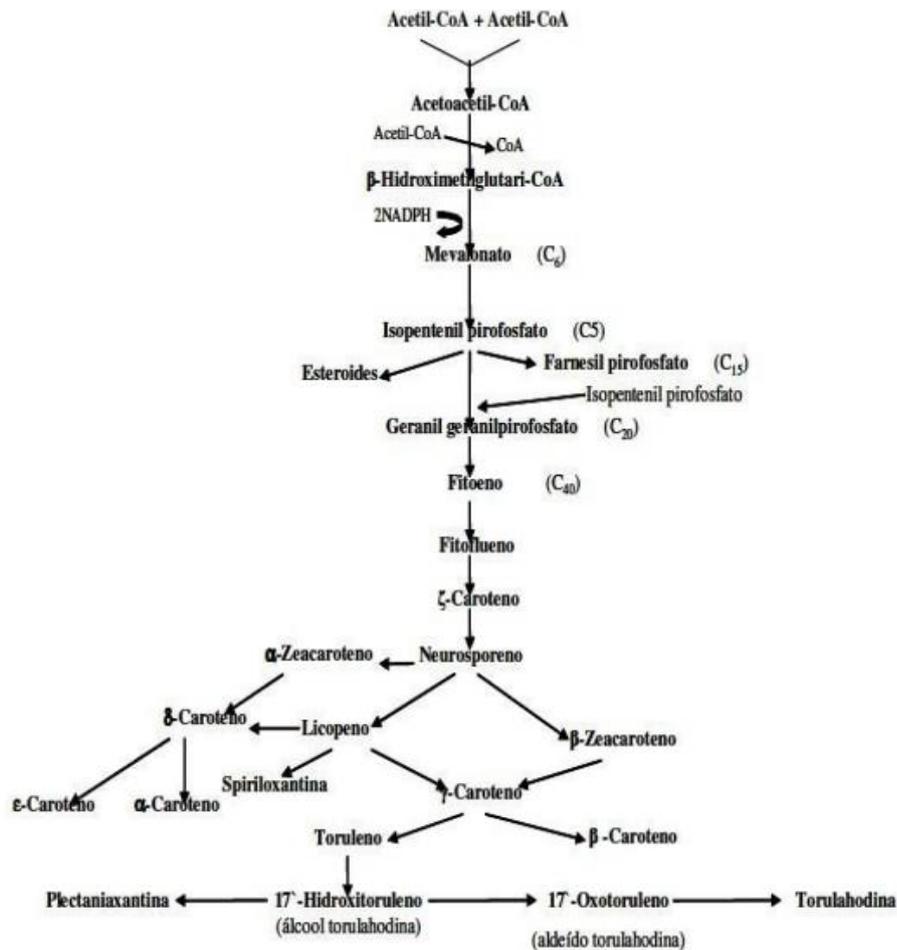
De acordo com Oliveira et al. (2009), leveduras produtoras de pigmento, também se destacam por despertar grande interesse para a produção de pectinases em larga escala, apresentando vantagens quando comparadas aos fungos filamentosos, já que são unicelulares,



No organismo humano, tais carotenoides apresentam atividade antioxidante, sendo estes capazes de inibir a oxidação de substratos de maneira eficaz, quando comparados a substratos oxidáveis. Ao ingerirmos alimentos que possuem esse composto, como frutas e vegetais, ou alimentos os quais os carotenoides foram adicionados na forma de pigmento, contribuimos para a modulação do metabolismo de forma a melhorar as atividades celulares do corpo humano, como o aumento da resposta imune, remoção dos radicais peróxidos, diminuição do metabolismo carcinogênico, inativação dos radicais livres, e diminuição de inúmeras doenças associadas ao estresse oxidativo (Shami & Moreira, 2004).

Outra característica importante é a capacidade dos carotenoides de atuarem como antimicrobianos, ou seja, são capazes de inibir o crescimento de microrganismos, causando efeitos adversos e proporcionando vantagem competitiva quando há mais de um microrganismo no ambiente em que estão (Rodrigues, 2009). Na **Figura 3**, destaca-se a rota metabólica de biossíntese de carotenoides por leveduras.

**Figura 3:** Rota metabólica de biossíntese de carotenoides em leveduras.



Fonte: Barbato, 2014.

Diversos microrganismos são capazes de produzir carotenoides, destacando-se as leveduras, por sua capacidade de crescimento rápido, utilizando substratos de baixo custo, sendo relatados principalmente como carotenoides extraídos de algumas espécies o  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, astaxantina, toruleno e a torularodina (Igreja, 2020).

### 2.3 Antimicrobianos

Antimicrobianos são substâncias produzidas com a finalidade de atuarem como bactericidas, quando têm a capacidade de afetar células bacterianas, ou atuarem como bacteriostáticos, inibindo o crescimento de diversos microrganismos (Guimarães, 2010). Sua ação pode estar ligada à interação em diferentes sítios celulares, interferindo na integridade da parede celular, permeabilidade da membrana, síntese de ácidos nucleicos e síntese proteica (Cunha et al., 2010).

Dentre os produtores dos antimicrobianos, estão os fungos, organismos capazes de produzirem tais substâncias, como os fungos endofíticos e as leveduras. Os fungos endofíticos são microrganismos que possuem a capacidade de sobreviverem dentro de algum tecido vegetal, sem causar danos aos hospedeiros, e trazendo a estes benefícios devido à produção de substâncias que inibem o crescimento de outros microrganismos, atuando como fitopatógenos e herbicidas (Martinez-Klimova et al., 2017). Foi possível observar também, ao longo dos anos, que a associação entre fungos endofíticos e seu hospedeiro traz inúmeros benefícios para ambas as espécies, sendo de grande interesse biotecnológico a obtenção em laboratório de tais compostos bioativos (Yan et al., 2019).

Já as leveduras também possuem a capacidade de produzir tais metabólitos que atuam como antimicrobianos. Algumas leveduras como *Rhodotorula spp*, *Phaffia Rhodozyma*, *Sporobolomyces ruberrimus*, *Sporidiobolus salmonicolor*, são exemplos de organismos produtores carotenoides (Valduga et al., 2009), pigmentos este ao serem extraídos, podem atuar como bactericidas ou bacteriostáticos.

Silva (2020) trabalhando com leveduras do gênero *Rhodotorula* extraídos a partir de frutos da caatinga, obteve resultados relevantes sobre a produção de carotenoides. Neste trabalho, foi observado que os pigmentos apresentaram um amplo espectro de atuação para atividade antimicrobiana, de modo que os carotenoides presentes no extrato foram suficientes para inibir o crescimento das bactérias avaliadas, alcançando em média de 56,8% de inibição para bactérias gram-negativas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*; e média de 52,9% para bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

## 2.4 Antioxidantes

Existem moléculas em nosso organismo que durante alguns processos metabólicos, atuam na liberação e transferência de elétrons, os chamados radicais livres. Porém, se a produção desses radicais livres ocorrer de forma exacerbada, pode acarretar danos às células do corpo, levando ao aparecimento de doenças e mal funcionamento dos sistemas que regulam o corpo humano (Shami & Moreira, 2004).

Tais danos podem ser diminuídos e evitados na presença dos antioxidantes, os quais tem o poder de neutralizar a ação dos radicais livres e contribuir para o bom funcionamento celular. Podemos absorver os antioxidantes consumindo frutas, verduras e legumes, pois, muitos destes possuem carotenoides em sua composição. Os carotenoides associados às vitaminas, possuem a capacidade de atuar como antioxidantes e prevenir o aumento dos radicais livres nos sistemas biológicos (Shami & Moreira, 2004).

Microrganismos como as leveduras também têm a elevada capacidade de produzir antioxidantes através do pigmento produzido por estas em sua estrutura celular, principalmente do grupo dos carotenoides, destacando-se entre eles o  $\beta$ -caroteno, astaxantina, toruleno e a torularodina por possuírem considerável atividade antioxidante (Igreja, 2020).

O  $\beta$ -caroteno, que pode ser produzido principalmente pela levedura *Phaffia Rhodozyma* e leveduras do gênero *Rhodotorula*, é muito utilizado com a finalidade de reduzir danos celulares e pela sua capacidade de proteção contra doenças cardiovasculares, sendo o carotenoide atualmente mais importante de interesse comercial. A astaxantina, encontrada nas leveduras *Xanthophyllomyces dendrorhous* e *Phaffia rhodozyma*, é um carotenoide de grande capacidade antioxidante, sendo o segundo mais importante comercialmente, porém sua produção e purificação ainda são consideradas de alto valor financeiro. Mesmo possuindo capacidade antioxidante elevada, os efeitos do toruleno e a toruladina sobre o corpo humano ainda não foram descritos. Estes carotenoides são produzidos como exemplo, pela *Rhodotorula rubra*, e são muito utilizados como corantes, por possuírem a cor amarelada (Igreja, 2020).

Algumas bactérias como a *Xylella fastidiosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chromobacterium violaceum* e *Bacillus cereus*, são capazes de sintetizar tais antioxidantes por conta do sistema proteico Ohr-OhrR, responsável pela regulação de várias funções biológicas das bactérias, sendo este sistema, um alvo promissor quanto à produção de antioxidantes, e também para a descoberta de novos fármacos antibióticos, atuando diretamente na proteína Ohr (Meireles, 2022).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos gerais**

Este trabalho objetivou analisar uma levedura endofítica, isolada de um tecido foliar, verificando suas potencialidades na produção de pigmentos carotenoides, bem como sua atividade enzimática, antibacteriana e antioxidante.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Isolar levedura a partir de porção do tecido foliar para cultivo e manipulação;
- Avaliar a atividade enzimática sobre o material lignocelulósico;
- Extrair pigmentos provenientes da colônia cultivada;
- Analisar as atividades antibacteriana e antioxidante provenientes dos carotenoides extraídos.
- Identificar a levedura em nível taxonômico de espécie.

### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica e de Biologia Molecular (LBBM), e de Microscopia da Universidade Federal de Uberlândia (LAMIC), *campus* Patos de Minas.

Assim, metodologias foram propostas para a determinação da capacidade de desconstrução do material holocelulósico, extração e caracterização parcial de pigmentos e a verificação das atividades antimicrobianas e antioxidantes presentes em extratos brutos obtidos pelo cultivo da levedura isolada.

#### **4.1 Isolamento da levedura e repique**

Para o isolamento da levedura, foi utilizado o protocolo padrão estabelecido em laboratório, e, em seguida, foi feito o repique das mesmas para a manutenção da cultura durante o experimento.

Foram colhidas três folhas, do terço mediano, de arbusto crescido utilizado para paisagismo, nas proximidades do Laboratório da Universidade Federal de Uberlândia *campus* Patos de Minas, localizado à Rua Major Jerônimo, 566, as quais foram colocadas em saco plástico.

O material vegetal foi lavado com água corrente e em seguida, sob condições assépticas, as folhas foram lavadas com água destilada esterilizada. Em seguida, estas foram sequencialmente submersas em etanol a 70 % com tween 20 (2 gotas de tween 20 para cada 100 mL de etanol) por 1 minuto, em hipoclorito de sódio contendo (2-2,5 % de cloro ativo) por 3 minutos, em etanol a 70 % com tween 20 por 30 segundos e, por último, foram lavadas com água destilada esterilizada abundantemente. Após a desinfecção superficial, com auxílio de bisturi esterilizado e ponteiros autoclavados, foram obtidos fragmentos com aproximadamente 5 mm de Ø a partir das folhas. Esses fragmentos foram inoculados na superfície de placas de Petri (15 cm de Ø), contendo meio BDA autoclavado [Batata 2,0 %, Dextrose 1,0 %, Ágar 2,0 % (m/v)] + cloranfenicol 0,01% (m/v), de acordo com a metodologia desenvolvida no LBBM da UFU.

A placa foi devidamente identificada e incubada durante 7 dias à temperatura de aproximadamente 25°, e o crescimento foi acompanhado a cada 24 horas. Finalmente, a placa foi fotografada e mantida à 4°C para conservação.

#### **4.2 Manutenção da cultura**

Foi realizada utilizando placas de Petri contendo meio sólido BDA, de forma que o repique foi feito a cada 21 dias. Após o crescimento, a placa de Petri foi armazenada à 4° C, no LBBM, da Universidade Federal de Uberlândia, *campus* Patos de Minas, de acordo com a metodologia desenvolvida no LBBM da UFU.

#### **4.3 Visualização microscópica da levedura**

Para visualização microscópica da levedura trabalhada, foi feita uma pequena raspagem do microrganismo a partir de uma placa de Petri com tempo de repique de 21 dias, transferindo-a para uma lâmina de vidro. Em seguida, com uma pipeta, a levedura foi coberta com a solução corante lactofenol azul de algodão, cobrindo com a lamínula. Esta foi levada ao microscópio para visualização da morfologia celular da levedura, de acordo com a metodologia desenvolvida no LAMIC da UFU.

#### 4.4 Cultivo para produção de pigmento

Para o cultivo da levedura em meio líquido, a fim de obter um maior crescimento celular foi preparado um meio suplementado (300 mL) contendo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,6 g),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (2,1 g),  $\text{MgSO}_4$  (0,15 g),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,3 g), e extrato de levedura (0,18 g). Em seguida, o meio suplementado foi dividido entre 4 *Erlenmeyers* (50 mL por frasco), e foram adicionados os substratos sacarose, glicose, e maltose, respectivamente, a 1% (m/v) (0,5 g por frasco), e o quarto *Erlenmeyer* sendo o controle, contendo apenas o meio suplementado. Foi preparado um quinto *Erlenmeyer* contendo 50 mL de caldo de batata (10 g de batata inglesa com casca cortada, fervida em 100 mL de água destilada, por 20 minutos; o caldo foi obtido após filtragem em peneira doméstica).

Em cada *Erlenmeyer* foram adicionados 5 fragmentos de meio sólido BDA (5 mm de  $\emptyset$ ) a partir de uma placa de Petri contendo a levedura com tempo de crescimento de 21 dias. Os frascos foram lacrados e levados para o *shaker*, onde permaneceram em agitação de 125 rpm, por 6 dias. Após esse período, cada conteúdo dos *Erlenmeyers* foi centrifugado a 3750 x g, por 5 minutos, para obtenção das células precipitadas. O sobrenadante foi separado e mantido à 4°C e as células precipitadas foram congeladas para posterior extração do pigmento.

#### 4.5 Ensaio para dosagem de amilase, pectinase, CMCase e xilanase

A partir de cada sobrenadante obtido, foram pipetados em tubos de ensaio (em triplicata) 50  $\mu\text{L}$  (representando as soluções de enzimáticas) + 100  $\mu\text{L}$  dos seguintes substratos: xilana 1% (m/v), pectina 1% (m/v) e carboximetilcelulose (CMC) a 0,5% (m/v). A mistura reacional foi incubada a 50°C por 30 minutos. Foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  do reagente DNS (m/v) [ácido 3,5-dinitro-salicílico 1,0% (m/v), NaOH 16% (m/v) e tartarato de sódio e potássio (4H<sub>2</sub>O) 30% (m/v), diluídos em água destilada], e os tubos de ensaio foram fervidos por 10 minutos. Finalmente foram adicionados 1500  $\mu\text{L}$  de água destilada em cada um dos tubos de ensaio, e foram feitas as leituras em espectrofotômetro (Gehaka UV-349G) a 540 nm, de acordo com a metodologia de Miller (1959).

Para dosagem da atividade amilase, uma mistura de reação foi constituída de 0,1 mL de cada sobrenadante com 0,1 mL de solução de amido solúvel 0,5% (m/v) gelatinizado em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0, e incubadas a 50°C durante 10 minutos. Após incubação, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  do reagente DNS. A mistura foi aquecida em banho fervente durante 10

minutos; após resfriado, a mistura reacional foi diluída em 2,0 mL de água destilada, e as leituras em espectrofotômetro realizadas a 540 nm (Oliveira, 2017).

Curvas de calibração para D-xilose, ácido D-galacturônico e D-glicose foram preparadas, anteriormente, para concentrações finais de 0,2 a 1,2 mg.mL<sup>-1</sup>. Uma unidade de atividade enzimática (UI.mL<sup>-1</sup>) foi definida como a quantidade de açúcar redutor liberado na unidade de tempo por mililitro ( $\mu\text{mol de açúcar redutor} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).

#### **4.6 Dosagem de açúcar redutor total**

Em tubos de ensaios, foram pipetados 150  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante obtido no item anterior, juntamente com 300  $\mu\text{L}$  de DNS. As amostras foram fervidas por 10 minutos, e logo em seguida foram adicionadas 1500  $\mu\text{L}$  de água destilada. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 540 nm, de acordo com a metodologia de Miller (1959). Com os valores de absorbância e a calibração da curva de DNS para D-glicose, foi possível obter a concentração de açúcar redutor total, em mg.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.7 Extração do pigmento**

As células, que estavam em tubos de ensaio, foram rompidas utilizando 6,0 mL de DMSO (PA/ACS) e 2,0 mL de acetona (PA), por 30 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 5 minutos a 3750 x g, de forma o pigmento estivesse disperso em sua maioria meio líquido e as células ficassem incolores. Foi adicionado à fase solvente 0,5 mL de uma solução de NaCl a 20% (m/v), e 2,0 mL de éter de petróleo (PA). Essa mistura foi agitada em *vórtex* e a fase contendo o éter de petróleo foi removida. Finalmente, a fase solvente foi filtrada utilizando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para a remoção da umidade (Fonseca, 2011). Finalmente, a solução contendo o pigmento extraído foi submetida a análise em espectrofotômetro cobrindo uma faixa de leitura 400 nm a 700 nm.

#### **4.8 Teste para verificação de efeito antibacteriano**

Para esse teste, foram utilizadas bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e bactérias gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), ambas devidamente mantidas na coleção do Laboratório de Microbiologia da UFU, *campus* Patos de Minas. Foi

feita a semeadura nas placas de Petri utilizando *swab* para que a cultura ficasse homogênea. Após semeadura, foram colocados discos de papel absorvente de aproximadamente 5 mm diâmetro, contendo: (1) amostra do pigmento extraído; (2) um disco imerso apenas em DMSO (PA, ACS); (3) um disco imerso apenas em acetona (PA), (4) um disco adsorvido por antibiótico Penicilina 10 U.I (para o *S. aureus*) (5) e um disco adsorvido por Ampicilina 10mcg (para *E. coli*); sendo os 4 últimos referidos como controle. As placas foram fechadas e levadas para a estufa à 35°C por 24 horas, de acordo com a metodologia desenvolvida no LBBM da UFU.

#### 4.9 Determinação da atividade antioxidante – método DPPH

Após a obtenção dos extratos brutos dos pigmentos, foram selecionadas as amostras contendo pigmento extraído, obtidas posteriormente aos cultivos da levedura nos substratos como glicose e sacarose, pois nestas fontes de carbono houve maior expressão de pigmentação (determinada visualmente), dentre as outras amostras. O primeiro teste foi a avaliação da atividade antioxidante por meio do método do sequestro dos radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), realizada de acordo com a metodologia de Lopes-Lutz et al. (2008) com de pequenas modificações. As concentrações utilizadas foram 500, 1000, 2000, 4000 mg.mL<sup>-1</sup>. Para a avaliação, 2,7 mL da solução de DPPH foram adicionados em tubos de ensaio, seguidos da adição de 0,3 mL de cada amostra de pigmento. Em paralelo, foi preparado também em um tubo de ensaio, o branco para retirada da cor e o controle negativo foi preparado contendo todos os reagentes, exceto o extrato. Após 60 minutos deixados no escuro, leituras foram realizadas utilizando o espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm. A atividade antioxidante (AA%) foi calculada usando a seguinte Equação (1):

$$AA \% = \left[ \frac{(A_{cn} - A_{amo})}{A_{cn}} \right] \times 100 \quad (1)$$

Em que:

$AA \%$  = Porcentagem de atividade antioxidante.

$A_{amo}$  = Absorbância do DPPH com a amostra.

$A_{CN}$  = Absorbância do DPPH com o etanol.

#### 4.10 Determinação da atividade antioxidante – método ABTS

Finalmente, foi realizado o teste do radical ABTS ((2,2-azinobis- [3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]), de acordo com Antunes et al. (2010). Para o ensaio foram misturados 10 µL do extrato (500, 1000, 2000, 4000 mg mL<sup>-1</sup>) e 990 µL da solução do radical ABTS•+. As amostras foram deixadas no escuro durante 6 minutos e após esse tempo, a absorbância foi monitorizada espectrofotometricamente a 735 nm. A absorção de uma amostra contendo a mesma quantidade de etanol e uma solução do radical ABTS•+ atuaram como controle negativo. A porcentagem de inibição do radical ABTS•+ pelas amostras foi calculada de acordo com a seguinte Equação (2):

$$AA \% = \left[ \frac{(A_{cn} - A_{am})}{A_{cn}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Em que:

AA % = Porcentagem de atividade antioxidante.

A<sub>CN</sub> = Absorbância do controle negativo

A<sub>Am</sub> = Absorbância da amostra

#### 4.11 Determinação dos fenólicos totais

Para esta metodologia, também foram selecionadas as amostras contendo pigmento, obtidas posteriormente aos cultivos da levedura nos substratos glicose e sacarose, pois estes apresentaram maior intensidade de pigmentação, dentre as demais. O teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o procedimento descrito por Singleton e Rossi (1965). Foi reagido 0,50 mL da amostra com 2,5 mL (0,2 mol L<sup>-1</sup>) do reagente Folin-Ciocalteu. Posteriormente, 2 mL de solução saturada de carbonato de sódio (75 g L<sup>-1</sup>) foi adicionado à mistura reacional. As leituras de absorbância foram realizadas a 760 nm após incubação à temperatura ambiente, durante 2 h. Uma solução de ácido gálico (16,125; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg mL<sup>-1</sup>) foi utilizada como padrão de referência e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico (mg GAE) por 100 g da amostra. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### 4.12 Análise estatística

Para a avaliação dos resultados dos testes antioxidantes o experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (2 x 4), sendo 2 amostras contendo pigmento em 4 concentrações (500, 1000, 2000, 4000 mg mL<sup>-1</sup>), com 3 repetições. Já para o teor de compostos fenólicos totais, o experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 3 repetições. O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (Ferreira, 2011), sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de porcentagem em relação às concentrações analisadas (DPPH e ABTS). Já para o teste do teor de fenólicos totais os resultados foram plotados em gráficos de barras com os valores de equivalentes ao ácido gálico, expressos em miligramas de ácido gálico (mg GAE) por 100 gramas da amostra. O software utilizado foi o GraphPad Prism versão 5.01.

#### 4.13 Extração de DNA para identificação

Após repique da levedura, esta foi raspada da placa de Petri e colocada em microtubo de 2,0 mL contendo solução salina. Em seguida, foi centrifugada a 3570 x g e o sobrenadante descartado. Foi adicionado 1,8 mL de tampão nos microtubos contendo a levedura e estes foram agitados em *vórtex* por 60 segundos. Estes foram então levados ao banho maria por 15 minutos a 65°C, logo em seguida agitados novamente em *vórtex* por 30 segundos. O sobrenadante foi transferido para microtubos novos de 2,0 mL e centrifugados a 17600 x g por 7 minutos. Foi acrescentado isopropanol (P.A) 100% gelado e novamente os tubos foram centrifugados, a 5.104 x g por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o pellet contendo o material genético ficou em repouso por alguns minutos para secagem em temperatura ambiente. Foi feita a lavagem do pellet utilizando 500 uL de etanol 70% (v/v) gelado. O etanol foi descartado. Finalmente, o DNA foi ressuscendido em 200 µL de água, e os frascos foram mantidos a -20°C.

#### 4.14 Amplificação das regiões espaçadoras transcritas internas do rDNA 18S

Para a amplificação do DNA extraído, foram preparados 4 microtubos para as reações de amplificação. Em cada microtubo foi adicionado 1 µL do primer *forward* ITS1, 1 µL do primer *reverse* ITS4, 10 µL kit Hot Start Master mix 1C (contendo dNTP's, Taq polimerase,

MgCl<sub>2</sub>). Cada microtubo foi agitado em *vórtex* por 30 segundos para homogeneização dos reagentes. No primeiro microtubo foi adicionado 1,0 µL do DNA de fungos, previamente extraídos, e utilizados para controle positivo; no segundo microtubo foi adicionado 1,0 µL de água estéril para controle negativo; no terceiro microtubo foi adicionado 1,0 µL da amostra de DNA da levedura. Em seguida, a amostra de DNA foi diluída em 10% água estéril, e 1,0 µL da diluição foi adicionado no quarto microtubo. O volume final foi completado com água estéril, totalizando 20 µL em cada microtubo. Os microtubos foram inseridos no termociclador TX96 (Amplitherm) e foi iniciado o ciclo de amplificação: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos - desnaturação, 30 segundos a 94°C; anelamento, 30 segundos a 52°C e extensão, 1 minuto e 40 segundos a 72°C e extensão final a 72°C por 7 minutos.

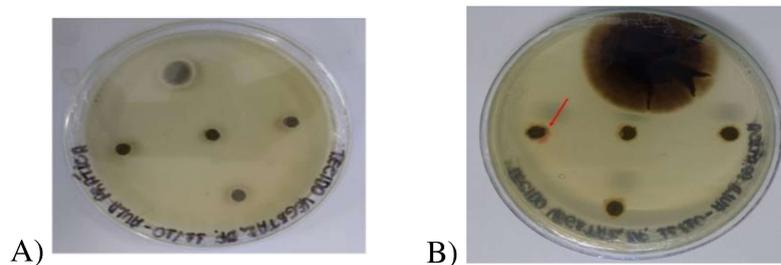
O amplicon foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose a 1,0 %, a 75 V por 30 minutos, com aplicação de 3,0 µL de amostra e, ao final corados com GelRed (Sigma). A avaliação do tamanho do produto foi realizada utilizando o marcador 1kb.

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização macro e micro morfológico do isolado fúngico e a produção de pigmentos

No presente trabalho, foi descrito o isolamento de um indivíduo fúngico a partir de fragmentos foliares obtidos de um vegetal utilizado normalmente em paisagismo. De acordo com Vale et al (2021), leveduras são comumente encontradas em folhas e frutos do Cerrado Brasileiro, e diversas espécies, como a *Rhodotorula mucilaginosa* são endofíticas, propiciando o aparecimento de tais espécies em diversas plantas do ambiente.

**Figura 4:** Na **Figura 4 A)** é apresentada a placa de Petri contendo os microrganismos que sobreviveram e cresceram, após a assepsia da folha coletada. Em **B)** é possível a visualização da colônia rosada da levedura se destacando dentre as demais colônias.



Fonte: Autor, 2023.

Após isolamento, a levedura foi mantida em placa de Petri, por meio de repiques sucessivos, a cada 21 dias, em temperatura de aproximadamente 28°, conforme observado na **Figura 5**.

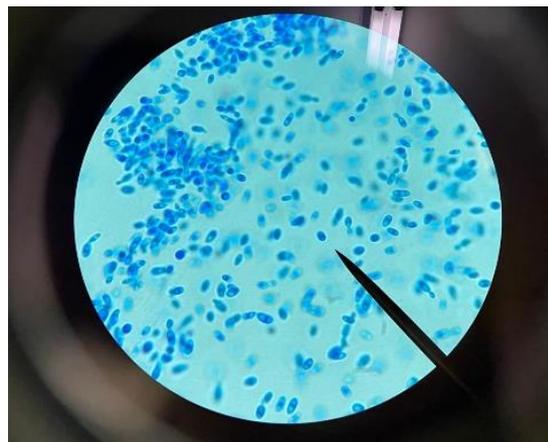
**Figura 5:** Superfície de uma placa de Petri contendo meio BDA: a levedura isolada foi mantida em crescimento para posterior análise em laboratório.



Fonte: Autor, 2023.

Após caracterização macroscópica, foi feita a visualização microscópica da levedura, a fim de ter maior conhecimento sobre a morfologia celular do indivíduo objeto do presente estudo. (**Figura 6**).

**Figura 6:** Visualização microscópica da levedura, utilizando a objetiva de 100x.



Fonte: Autor, 2023.

Em termos macroscópicos, observou-se uma colônia com textura pastosa, de contornos lisos contendo algumas reentrâncias; como característica de destaque foi observado uma coloração rosada/alaranjada, não difusível no meio BDA (**Figura 5**). Em nível microscópico,

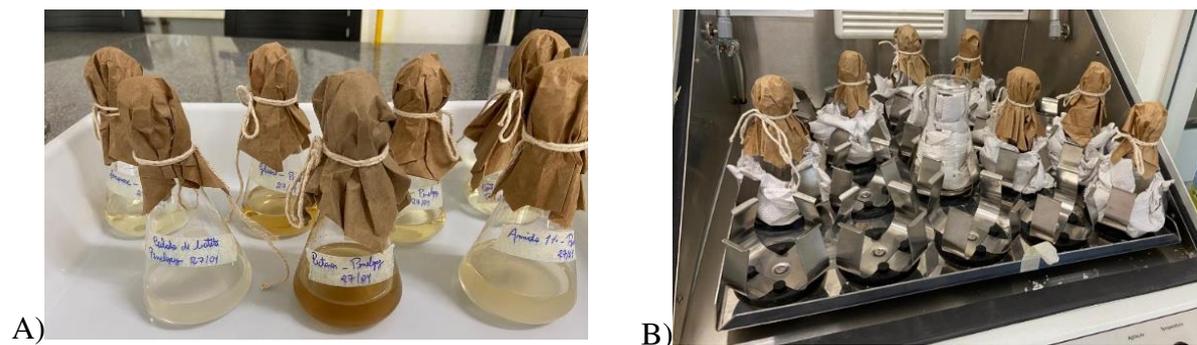
na **Figura 6** foi visualizado um aspecto unicelular da amostra, com células ligeiramente ovaladas, e processos de reprodução celular por brotamento.

Com base nas características apresentadas pelo isolado, foi feita busca por outros autores que também haviam trabalhado com leveduras produtoras carotenoides e expressavam a cor rosada/alaranjada na estrutura celular.

De acordo com Igreja (2020), as leveduras que expressam tal coloração pertencem as espécies *Sporidiobolus spp*, *Phaffia rhodozyma*, e *Rhodotorula spp*; e também algumas espécies do gênero *Sporobolomyces* e *Rhodospiridium*. Estas espécies vêm sendo relatadas como boas produtoras de carotenoides, e amplamente utilizadas na biotecnologia com a finalidade de obter novos compostos de interesse industrial e comercial.

Posteriormente ao repique e visualização, foi feito o cultivo em meio líquido objetivando o aumento do volume celular, por meio de diferentes substratos como fonte de carbono, avaliando-se as melhores condições de crescimento e expressão de carotenoides (**Figura 7 A e B**). Os Erlenmeyers permaneceram em agitação por um período de 6 dias.

**Figura 7: A)** Cultivo submerso utilizando diferentes substratos (caldo de batata, sacarose, glicose, e maltose, respectivamente, todos a 1%): o cultivo foi realizado em meio líquido em volume de 50 ml, a 28°C por 6 dias. **B)** Erlenmeyers no *shaker*, para agitação e crescimento celular.



Fonte: Autor, 2023

Após os 6 dias, os Erlenmeyers foram retirados do *shaker*, para então serem separados duas frações: as células pigmentadas e o sobrenadante contendo o extrato enzimático (**Figura 8**).

**Figura 8:** Erlenmeyers após 6 dias de cultivo.



Fonte: Autor, 2023.

Na **Figura 8**, foram observadas diferenças quanto a coloração expressa pela levedura nos diferentes substratos nos quais foi cultivada, variando de rosada/alaranjada a branca. As diferentes cores sugerem que este microrganismo tem preferências por tipos específicos de fontes de carbono, expressando a cor rosada/alaranjada e maior crescimento celular nos meios que continham Glicose, Sacarose e Caldo de Batata.

Silva (2009), trabalhando com a levedura *Phaffia rhodozyma* para produção do pigmento astaxantina, descreveu que para a maioria das cepas desta espécie de levedura, as fontes de carbono utilizadas para a produção de carotenoide incluem glicose, maltose, sacarose, celobiose, xilose, arabinose e lactose. Isso mostra que, assim como a levedura utilizada no presente trabalho, a glicose e a sacarose são as fontes de carbono preferenciais para produção de carotenoides por leveduras.

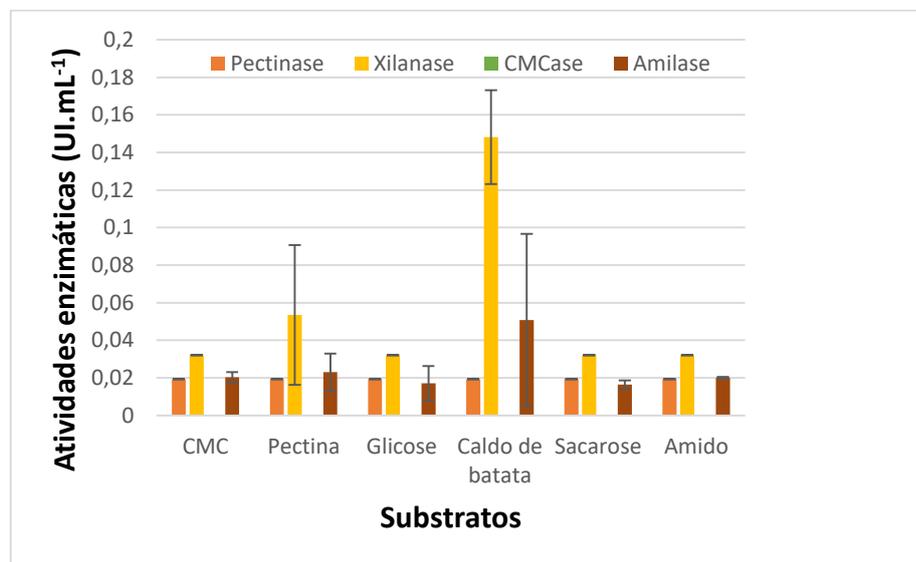
## **5.2 Caracterização dos extratos quanto ao perfil enzimático e dosagem de açúcares redutores totais**

As amostras foram submetidas a ensaios enzimáticos para quantificação, de Pectinase, Xilanase, CMCase e Amilase. Após leitura em espectrofotômetro, foi possível perceber o perfil de preferência da fonte de carbono consumida pela levedura. Dentre os substratos analisados, o caldo de batata apresentou maiores níveis de atividade enzimática, sugerindo ser a fonte de carbono mais indutora da capacidade de produção enzimática da levedura isolada. Dentre as enzimas que foram analisadas, a xilanase mostrou destaque em todos os substratos testados, apresentando maiores valores no caldo de batata com  $0,149 \pm 0,025 \text{ UI.mL}^{-1}$ , e também para

pectinase com  $0,053 \pm 0,037 \text{ UI.mL}^{-1}$ . Já ensaio para a enzima CMCase, os valores de atividade foram bem reduzidos, quase nulos, em todos os substratos testados. A enzima pectinase teve sua atividade com valores praticamente constantes em todos os substratos, e a amilase obteve maior atividade no substrato caldo de batata. O gráfico apresentado na **Figura 9**, ilustra os dados obtidos após análise das atividades enzimáticas e os respectivos substratos.

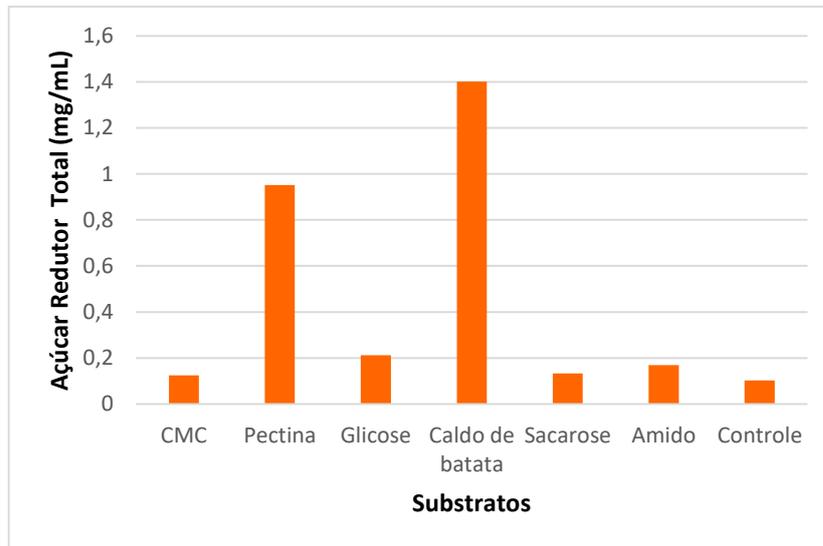
De acordo com Vale et al (2021), *R. mucilaginoso* é uma espécie de fungo encontrada no solo, nas rochas, nos troncos das árvores e, por colonizarem os mais diversos ambientes, são capazes de sintetizar uma grande variedade de enzimas. Em seu trabalho os autores detectaram 4 tipos de enzimas produzidas por essa levedura, que são: celulase, protease, amilase e pectinase. Dentre as espécies de leveduras isoladas em seu trabalho, os gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Lodderomyces*, *Pichia* e *Rhodotorula*, são conhecidas pela diversidade de enzimas sintetizadas e também pela utilização para produção de enzimas de interesse industrial.

**Figura 9:** Quantificação das atividades enzimáticas dos extratos brutos obtidos posteriormente ao cultivo da levedura em diferentes fontes de carbono; as atividades enzimáticas foram realizadas a  $50^{\circ}\text{C}$  e tempo de incubação de 30 minutos.



Fonte: Autor, 2023

**Figura 10:** Quantificação dos açúcares redutores liberados posteriormente ao cultivo da levedura em diferentes fontes de carbono; as amostras foram adicionadas em solução de DNS e submetidas à fervura por 10 minutos; as leituras das atividades foram realizadas em 540 nm; e os valores de açúcar redutor total obtidos em mg/mL.



Fonte: Autor, 2023.

De acordo com a **Figura 10**, é possível perceber que houve elevada quantidade de açúcar redutor total presente nos extratos caldo de batata e pectina, respectivamente. Foi observado também o contraste destes valores quando comparados aos outros substratos testados, que demonstraram valores abaixo de 0,2 mg/mL. Este resultado mostra que as maiores atividades enzimáticas induzidas no caldo de batata e na pectina, e que foram apresentadas na Figura 9, sugere um perfil mais eficiente de sacarificação para estas fontes de carbono.

Barbosa (2017), trabalhou com a levedura *Rhodotorula glutinis*, e verificou o potencial de produção de Betacaroteno a partir de resíduo da produção de farinha. Neste estudo, analisou o perfil do consumo de açúcares redutores provenientes de suas amostras, onde constatou que certas fontes de carbono possuem menor potencial para crescimento da levedura do que outras, levando à apresentação de variâncias entre as fontes estudadas. De acordo com a autora, a levedura utilizada, também apresentou uma diminuição na concentração de carotenoides, conforme as diferentes fontes de carbono do meio.

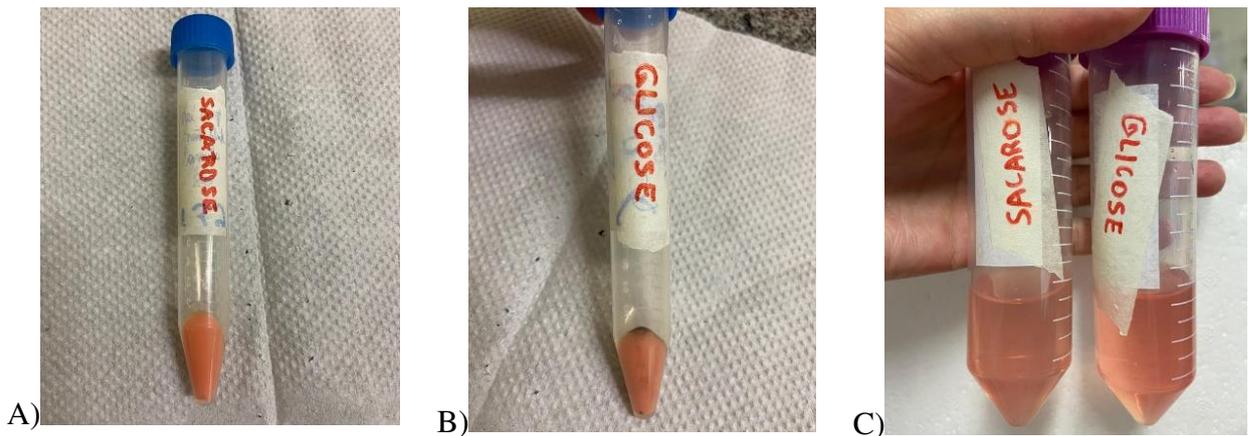
Tais informações podem nos sugerir que as discrepâncias apresentadas nas quantidades de açúcar redutor do presente estudo podem estar relacionadas à fonte de carbono utilizada nos

diferentes meios de cultivo, e assim, a levedura apresentou maior eficiência na sacarificação em meios de cultivo contendo caldo de batata e pectina.

### 5.3 Extração de pigmento

Foram extraídos pigmentos das amostras obtidas pós cultivo da levedura em glicose e sacarose, pois estes revelaram maior expressão visual da cor, quando comparadas às outras amostras testadas. Os outros substratos apresentaram coloração celular esbranquiçada, paralelamente a glicose e sacarose que apresentaram coloração rosada/alaranjada, conforme podemos observar na **Figura 11 A), B) e C)**.

**Figura 11:** Células contendo expressão de pigmento rosado/alaranjado anteriormente à extração, apresentadas na imagem A) e B); e imagem C) com pigmento após extração.



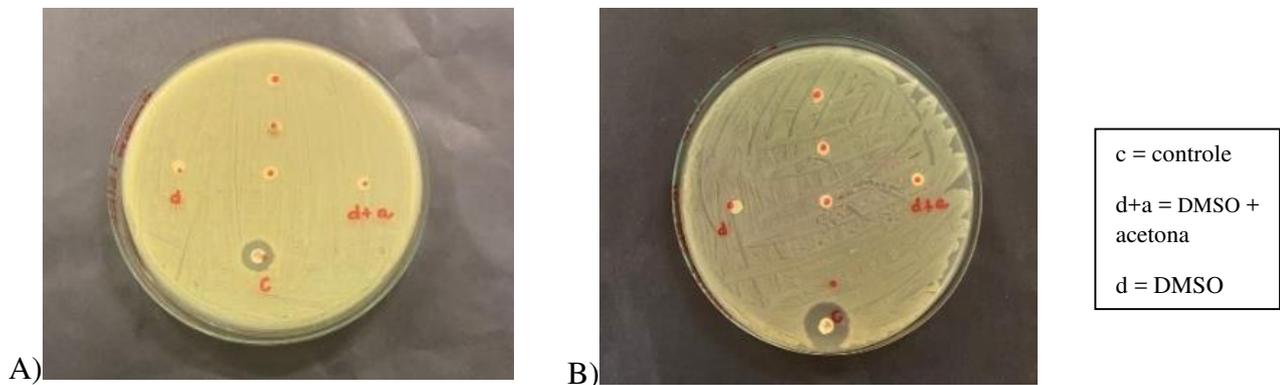
Fonte: Autor, 2023

Cavalcanti e Stamford (2015), trabalhando com produção e extração de pigmentos carotenoides por *Rhodotorula minuta* e *Rhodotorula aurantiaca*, utilizaram também em sua metodologia a acetona e o DMSO adicionados sobre o precipitado celular. Tais autores objetivaram o rompimento das células e obtenção dos pigmentos produzidos pelas leveduras, e liberação dos mesmos. No presente estudo foi utilizada metodologia semelhante à utilizada pelas autoras, as quais obtiveram resultados satisfatórios quanto aos pigmentos extraídos e também nas quantidades de beta-caroteno alcançadas. Este trabalho corrobora a assertividade da metodologia utilizada no presente estudo, a qual foi adequada para a extração dos pigmentos carotenoides, e vem sendo amplamente utilizada para esta finalidade.

#### 5.4 Teste para verificação do efeito antibacteriano do pigmento pós-extração

Após o período de incubação, foi possível observar o crescimento das bactérias em ambas as placas. Porém, não houve resultados positivos quanto a inibição do crescimento destes microrganismos pelo extrato do pigmento. Apenas houve o halo de inibição ao redor do disco de antibiótico (controle positivo para o efeito antimicrobiano), conforme podemos observar na **Figura 12 A e B**.

**Figura 12:** Placas de Petri após 24 horas de incubação a 35°, sendo a imagem **A)** contendo a bactéria *S. aureus*, e a imagem **B)** contendo a bactéria *E. coli*. O extrato do pigmento não demonstrou efeito na inibição do crescimento para as bactérias testadas.



Fonte: Autor, 2023.

Martins et al (2021), trabalhando com avaliação antimicrobiana de extratos de diferentes variedades de *Olea europaea*, teve como uma das suas metodologias de trabalho, a busca pela técnica de difusão de disco para verificar se o composto avaliado, no caso o extrato de oliveira, possuía ação antimicrobiana. Os autores encontraram diversos resultados positivos frente a técnica, o que mostra a eficácia dos discos para inibição do crescimento de bactérias, quando estas entram em contato com compostos que impedem seu crescimento.

Silva (2020), trabalhando com leveduras *Rhodotorula glutinis*, após obtenção do extrato de pigmentos carotenoides obtidos da biomassa, também realizou testes para avaliação antimicrobiana, e obteve resultados positivos em seus experimentos. *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* e *B. subtilis* foram sensíveis nas concentrações avaliadas do extrato de carotenoides produzido por *R. glutinis*. Além disso, todas as bactérias testadas apresentaram sensibilidade maior que 50% na presença do extrato. Tais resultados positivos sugerem a eficácia de pigmentos carotenoides extraídos de leveduras e mostram a importância da

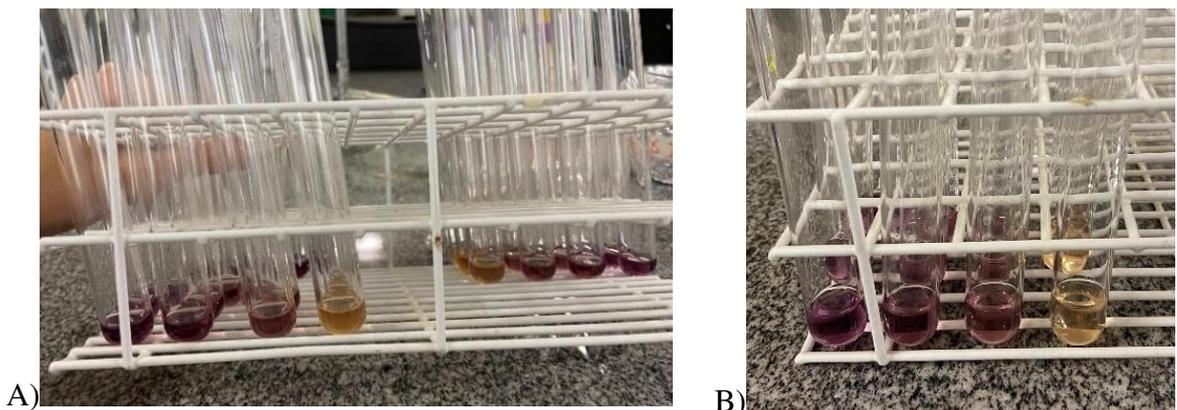
constante busca por novos extratos e a descoberta de novas substâncias potencialmente antimicrobianas.

Como visto acima, as metodologias do uso do disco de imersão e dos pigmentos carotenoides, se mostram efetivos em outros estudos, o que nos sugere que melhorias na metodologia são necessárias para um possível resultado positivo em análises futuras. Uma hipótese, seria a diminuição da quantidade de líquidos no qual o pigmento está imerso (DMSO e acetona), o que tornaria o pigmento mais concentrado.

### 5.5 Resultado dos testes antioxidantes (DPPH e ABTS) e de compostos fenólicos

Para o teste antioxidante pelo método DPPH, as amostras contendo diferentes concentrações, após ficarem por um período de 60 minutos no escuro, apresentaram mudança de cor, de roxo para tons amarelados, o que evidenciou a presença de compostos antioxidantes. A tonalidade amarela se mostrou presente nos tubos de ensaio que continham maior concentração do pigmento enquanto as amostras com menores quantidades apresentaram leves alterações na cor.

**Figura 13:** Tubos de ensaio contendo os pigmentos após 60 minutos de reação. Em **A)**, é possível observar os reagentes juntamente ao pigmento, ambos concentrados. Em **B)**, a solução apresenta-se diluída para melhor visualização.



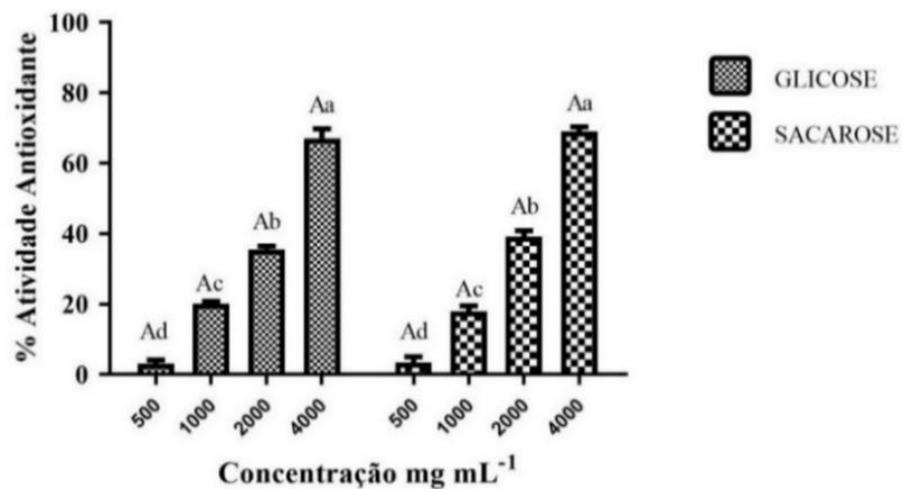
Fonte: Autor, 2023.

Conforme pode ser observado na **Figura 13**, os tubos de ensaio contendo os pigmentos a partir de fontes de carbono D-glicose e sacarose, apresentaram mudança de cor, de roxo para amarelo, conforme maior concentração do pigmento. Na **Figura 13 A)**, pode-se observar a reação concentrada; já na **Figura 13 B)** a reação foi diluída com a adição de 1000 uL de água

destilada para melhor visualização da alteração cores. Da esquerda para direita podemos visualizar com clareza o aumento da concentração do extrato, sendo que este quando está em maior concentração se torna amarelo na presença do reagente.

Na **Figura 14**, são apresentadas as porcentagens de atividade antioxidante em relação às diferentes concentrações do extrato do pigmento pós extração em  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

**Figura 14:** Atividade antioxidante presente nas amostras contendo pigmento nas diferentes concentrações em  $\text{mg.mL}^{-1}$ .



Fonte: Autor, 2024.

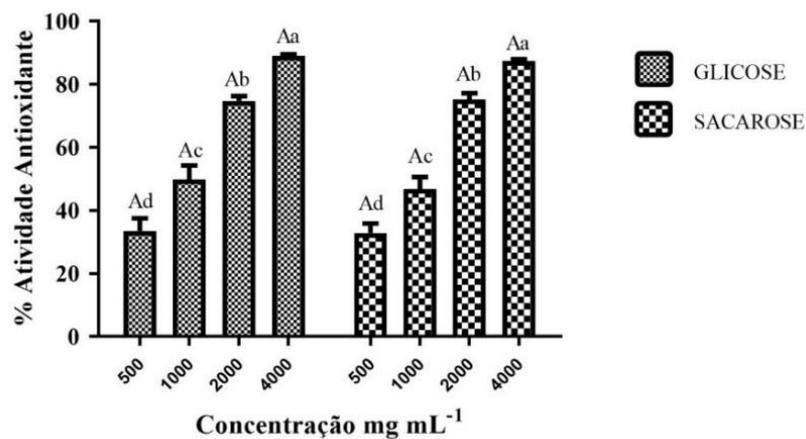
No gráfico acima, a letra maiúscula representada por “A” compartilhada em ambos os gráficos mostra que eles são estatisticamente iguais. Já as letras minúsculas, diferenciam variações específicas dentro desses grupos. No gráfico as diferentes concentrações de glicose e sacarose são representadas pelas letras minúsculas “a”, “b”, “c” e “d”.

Como é possível perceber, conforme o aumento da concentração do pigmento, maior foi o valor da atividade antioxidante, gerando resultados positivos para o teste realizado e evidenciando também, a necessidade de novos ensaios com maiores quantidades do pigmento bruto para análises dos compostos ali presentes.

Foi realizado também o teste ABTS para detecção de compostos antioxidantes totais. Os resultados foram expressos conforme a **Figura 15**, que apresenta a porcentagem de atividade antioxidante em  $\text{mg.mL}^{-1}$ .

De acordo com Sucupira et al (2012), o método ABTS apresenta vantagem em relação a outros métodos pela possibilidade de ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis e apresenta excelente estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante, oferecendo resultados facilmente reproduzíveis.

**Figura 15:** Atividade antioxidante total presente nas amostras do extrato do pigmento nas diferentes concentrações em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , utilizando o método ABTS.



Fonte: Autor, 2024.

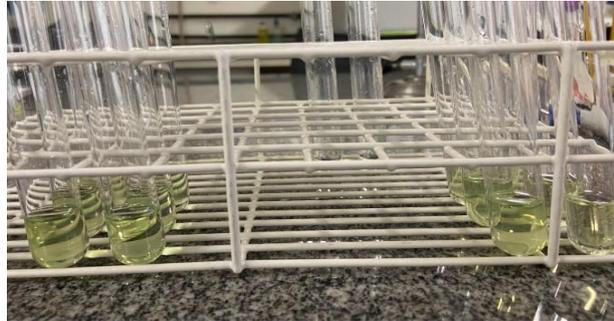
O gráfico nos revela que quanto maior a quantidade de pigmento presente, maiores são os níveis de atividade antioxidante, não sendo observadas diferenças em relação à fonte de carbono utilizada para o crescimento da levedura, D-glicose e sacarose respectivamente.

Assim como no gráfico para o teste do DPPH, a letra maiúscula representada por “A” mostra que eles são estatisticamente iguais. Já as letras minúsculas, diferenciam variações específicas dentro desses grupos. No gráfico as diferentes concentrações de glicose e sacarose também são representadas pelas letras minúsculas “a”, “b”, “c” e “d”.

Já para o teste de verificação de compostos fenólicos, pelo método Folin- Ciocalteu, após um período de 2 horas, os tubos de ensaio que continham as amostras de pigmento juntamente com o reagente, em triplicata, apresentaram uma discreta mudança na cor.

Conforme pode ser visualizado na **Figura 16**, houve uma sutil mudança na coloração das amostras no tubo de ensaio, o que sugere uma pequena presença de compostos fenólicos nas amostras contendo pigmento.

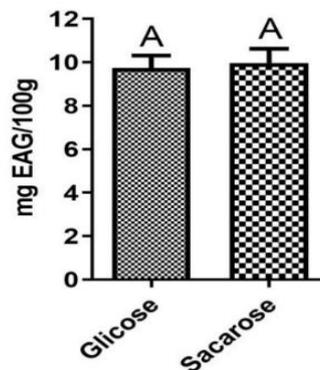
**Figura 16:** Tubos de ensaio após 2,0 horas de reação. Na esquerda, é possível visualizar, os tubos de ensaio contendo o pigmento produzido na presença do substrato D-glicose, já na direita os tubos contendo o pigmento produzido na presença do substrato sacarose, ambos contendo o reagente Folin Ciocalteu.



Fonte: Autor, 2023

Na **Figura 16**, é possível visualizar uma sutil mudança na coloração que foi de amarelo para um tom esverdeado mais claro, podendo sugerir uma pequena quantidade de compostos fenólicos no extrato do pigmento pós extração.

**Figura 17:** Quantificação de compostos fenólicos totais presentes nas amostras dos extratos do pigmento nas diferentes concentrações em mg.GAE/100g.



Fonte: Autor, 2024.

Como é possível observar na figura acima, as quantidades de compostos fenólicos totais presentes tanto nas amostras contendo pigmento obtidas nos cultivos da levedura em glicose como substrato, quanto para a sacarose, apresentaram quantidades semelhantes estatisticamente em termos de compostos fenólicos representados pela letra maiúscula “A”, sugerindo que para tal atividade, ambas as fontes de carbono foram consumidas propiciando à levedura a formação de tais compostos. De acordo com Resende (2010) “a utilização do método é amplamente aplicada em pesquisa de produtos naturais antioxidantes porque é simples, sensível e preciso”.

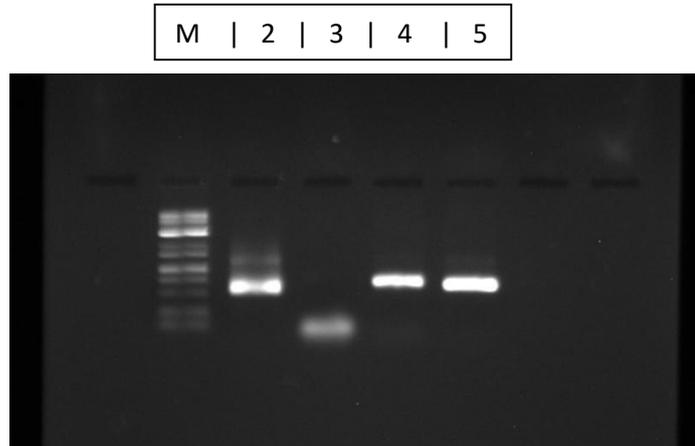
Salar et al (2013), trabalhando com *Rhodotorula glutinis*, após a obtenção dos extratos da levedura proveniente da biomassa celular, pela metodologia do DMSO, fizeram testes para análise da presença de compostos fenólicos totais e antioxidantes em diferentes cepas da levedura, uma cepa sendo o controle e outra após sofrer estresse oxidativo. Em seu trabalho, os autores utilizaram o método Folin Ciocalteu, DPPH e ABTS, para análise da presença de tais compostos no extrato bruto, e obtiveram resultados positivos quanto aos testes. Em seguida, após as cepas de levedura sofrerem o estresse oxidativo, foi observado que extratos de culturas cultivadas sob estresse apresentaram maior capacidade de eliminação de radicais do que culturas não estressadas. No geral, houve um aumento significativo no conteúdo fenólico de *R. glutinis* quando estressados com NaCl e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade antioxidante estabelecida pelo teste ABTS foi considerada mais alta em extratos de cultura estressados em comparação com amostras de controle. Da mesma forma, a capacidade antioxidante total determinada pelo teste DPPH também foi a mais alta em culturas estressadas com as mesmas substâncias.

No presente estudo, o objetivo da aplicação de tais testes foi para detecção da presença dos compostos antioxidantes e fenólicos possivelmente presentes no extrato da levedura, o que nos proporcionou um resultado positivo em todas as metodologias testadas conforme a quantidade de pigmento aumentou frente a presença dos reagentes. Analisando a metodologia dos autores utilizados como referência (Salar et al, 2013), é possível considerar um aumento de tais compostos ao expor a cepa da *Rhodotorula mucilaginosa* ao estresse oxidativo, aprimorando os resultados aqui obtidos, já que foram necessárias maiores quantidades de pigmento para o aparecimento dos resultados. Tal trabalho nos sugere que compostos fenólicos e antioxidantes estão presentes nos extratos obtidos em cepas de *Rhodotorula*, assim como foi detectado no presente estudo, que teve como objetivo detectar qualitativamente os componentes do pigmento gerado.

## 5.6 Resultado da análise do material genético extraído

Finalmente, foi obtido o resultado da análise do material genético da levedura extraído e sequenciado, visando uma possível identificação taxonômica. Podemos observar na **Figura 18**, a imagem do material genético após eletroforese, e na **Figura 19**, o resultado da taxonomia do microrganismo o qual foi trabalhado durante todo o presente trabalho, sendo identificada como *R. mucilaginosa*.

**Figura 18:** Imagem resultante do material genético da levedura após eletroforese. O amplicon foi visualizado em gel de agarose a 1%, a 75 V por 30 minutos, utilizando o marcador (M) 1kb; sendo a canaleta 1 o M, a 2 o controle positivo, a 3 o controle negativo, a 4 o DNA puro da levedura, e a 5 o DNA diluído a 10%.



Fonte: Autor, 2024

Os produtos obtidos foram encaminhados para o sequenciamento no Centro de Genômica do Distrito Federal, da Universidade Católica de Brasília. O sequenciamento do tipo Sanger, utilizando-se o 3130 Genetic Analyser, foi utilizado para a obtenção dos dados acerca do material genético da levedura.

**Figura 19:** Resultado da análise do alinhamento do material genético da levedura.

Pairwise results							
No.	Reference description	Score	Probability ?	Similarity ? ↓	Fragments ?	Overlap ?	Direction ?
1	CNRMA19.672 Rhodotorula mucilaginosa, n3: rDNA sequences ITS	782.97	0	100.00 %	1	100.00 %	+/+
2	CNRMA10.51 CNRMA10.51 - ITS1-ITS4 - Id#39676 Rhodotorula mucilaginosa, n5: rDNA sequence ITS (ITS1/ITS4)	782.97	0	100.00 %	1	100.00 %	+/+
3	CNRMA10.51 Rhodotorula mucilaginosa, n3: rDNA sequences ITS	782.97	0	100.00 %	1	100.00 %	+/+
4	CNRMA12.1026 Rhodotorula mucilaginosa, n3: rDNA sequences ITS	782.97	0	100.00 %	1	100.00 %	+/+
5	CNRMA12.1200 Rhodotorula mucilaginosa, n5: rDNA sequence ITS (ITS1/ITS4)	782.97	0	100.00 %	1	100.00 %	+/+

Fonte: Mycobank analysis, 2024.

Após análise da imagem e dos dados gerados, é possível concluir que a levedura trabalhada no presente estudo se trata da *R. mucilaginosa*, visto que após o sequenciamento do produto de amplificação a combinação resultou em 100% de similaridade com o microrganismo apresentado acima.

Na **Figura 20**, é também apresentada a imagem do resultado gerado pela ferramenta BLAST de análises do NCBI, o qual revelou alinhamento das sequencias intergênicas dos genes de RNA ribossomal de leveduras, com 100% de similaridade para a levedura *R. mucilaginosa*.

**Figura 20:** Resultado do alinhamento das sequencias de RNA ribossomal, utilizando a ferramenta BLAST de análises do NCBI.

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100				
Description		Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodotorula mucilaginosa small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Rhodotorula muc...	911	911	100%	0.0	100.00%	600	MT635319.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodotorula mucilaginosa strain 1.P2F internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Rhodotorula muc...	911	911	100%	0.0	100.00%	580	MT476908.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodotorula mucilaginosa strain 1.P3F internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Rhodotorula muc...	911	911	100%	0.0	100.00%	577	MT476907.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodotorula mucilaginosa strain 1.P12F internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Rhodotorula muc...	911	911	100%	0.0	100.00%	582	MT476905.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodotorula mucilaginosa strain 1.P15F internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Rhodotorula muc...	911	911	100%	0.0	100.00%	579	MT476903.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Rhodotorula mucilaginosa isolate 50 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and...	Rhodotorula muc...	911	911	100%	0.0	100.00%	568	MT443941.1

Fonte: NCBI, 2024.

De acordo com Mussagy et al (2023), leveduras do gênero *Rhodotorula* são pertencentes à família *Sporidiobolaceae*, apresentam divisão *Basidiomycota*, possuem células na forma esferoidal, ovoidal ou alongada e sua reprodução é assexuada por brotamento multilateral ou polar. Sua pigmentação vermelho-alaranjada é devido à uma elevada produção de carotenoides, que são responsáveis por proteger o microrganismo da luz UV-vis e do oxigênio singlete. Vários fatores influenciam na produção de carotenoides por tais microrganismos, como temperatura, pH, concentração de carboidratos no meio de cultivo, agitação e aeração do meio. As leveduras do gênero *Rhodotorula* são altamente eficientes na biossíntese de diversos compostos como corantes, enzimas e antioxidantes, e sua importância no meio científico e industrial aumentam conforme novas metodologias de análise surgem. Os autores também evidenciam o fato da ruptura celular para obtenção, solubilização e manutenção dos compostos ativos ainda não ser ecologicamente correta, pois utiliza-se quantidades significativas de hexano, clorofórmio, metanol, éter de petróleo, dimetilsulfóxido, acetona e clorofórmio, tendo a biotecnologia o papel de buscar soluções ecologicamente sustentáveis para tais atividades.

A levedura *R. mucilaginosa* apresenta vantagens quando comparada a outros microrganismos produtores de carotenoides por possuir rápido ciclo de crescimento, crescer em diversos substratos como resíduos agrícolas e diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Este também é um microrganismo com capacidade relevante de sobrevivência no meio ambiente por possuir resistência à luz ultravioleta por sua hiperpigmentação, que a protege em situações de estresse oxidativo, atuando também como antioxidante (Silva, 2023).

## 6. CONCLUSÃO

Nas condições testadas, a levedura revelou reduzida produção de enzimas pertencentes aos grupos das holocelulolases e amilases, dentre as quais, a atividade xilanase foi a mais expressiva.

Quanto ao efeito antimicrobiano, os resultados não foram relevantes frente às espécies de bactérias testadas. É possível que os extratos de pigmento necessitam ser concentrados, anteriormente à realização de ensaios adicionais.

Os extratos do pigmento apresentaram resultados positivos quanto à presença de compostos fenólicos e de antioxidantes, sugerindo promissora capacidade de produção de biocompostos anti-radicaais livres.

Finalmente, com os resultados da taxonomia da levedura isolada, foi possível identificar a espécie como *Rhodotorula mucilaginosa*. Essa etapa possibilita futuras aplicações e aprofundamento da pesquisa com a espécie, permitindo melhorias nas metodologias e aumento dos mecanismos de busca, que agora podem ser específicos para a *R. mucilaginosa*.

## REFERÊNCIAS

ANTUNES, M.D.C. et al. *Effects of postharvest application of 1-MCP and postcutting dip treatment on the quality and nutritional properties of fresh-cut kiwifruit*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, Davis, v.58, p. 6173–6181, 2010.

BARBATO, J.. *Estudo da obtenção de carotenóides por fermentação empregando a levedura Rhodotorula sp em melão e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura*. 2014. 42 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

BARBOSA, A. F. S.. *Cultivo de Rhodotorula glutinis em manipueira para a produção de suplemento vitamínico e proteico*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA, 2017

CUNHA, M. N. C., et al. *Actinomicetos produtores de inibidores de  $\beta$ -lactamases com atividade antimicrobiana frente a isolados de mastite bovina*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.62, n.6, p.1312-1319, 2010.

GUIMARÃES, D. O. et al. *Antibióticos: a importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes*. Química Nova, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

IGREJA, W. S.. *Produção de carotenoides por leveduras *Rhodotorula rubra*, utilizando caroço de açaí (*Euterpe Oleracea Mart.*) como substrato para a fermentação*. 2020. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

LARA, C. A. *Xilanases de leveduras e fungos leveduriformes e sua aplicação em processos de produção de bioetanol lignocelulósico e panificação*. Tese (Doutorado) - UFMG, Belo Horizonte, 2013.

LOPES-LUTZ, D. et al. *Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia essential oils**. Phytochemistry, v. 69, n. 8, p.1732-1738, 2008.

MARTINEZ-KLIMOVA, E. et al. *Endophytes as sources of antibiotics*. Biochemical Pharmacology, v. 134, p. 1–17, 2017.

MARTINS, O. A. et al (2021). *Métodos de avaliação antimicrobiana de extratos de diferentes variedades de *Olea europaea L.*: revisão de literatura*. Science and Animal Health, 9(3), p 180-199, 2021.

MATIOLI, G. & RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. *Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, vol.23, Dezembro, 2003.

MEIRELES D. A. et al. *Ohr – OhrR, a neglected and highly efficient antioxidant system: Structure, catalysis, phylogeny, regulation, and physiological roles*. Free Radical Biology and Medicine, Volume 185, 2022.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, v. 31, p. 426, 1959.

MOURA, S. C., et al. *Xilanases microbianas e suas aplicações industriais*. (Embrapa Agroenergia. Documentos, 38). Brasília: Embrapa Agroenergia, 2021.

MUSSAGY, C. et al. **Rhodotorula sp.*-based biorefinery: A source of valuable biomolecules*. Applied Microbiology and Biotechnology, 106, 7431–7447, 2022.

OLIVEIRA, L. F. R.. *Caracterização parcial de holocelulases e pectinases de isolado fúngico anemofílico cultivado em resíduos agrícolas*. 2019. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal de Uberlândia, Patos de Minas, 2019.

OLIVEIRA, R. Q. et al. *Produção de pectinases por leveduras: uma revisão*. SITIENIBUS série Ciências Biológicas, p. 41–47, 2009.

- OLIVEIRA, T. S. *Estudo da produção de enzimas amilolíticas utilizando resíduo agroindustrial (Manipueira)*. 2017. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2017.
- REZENDE, L. C.. *Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia*. 118 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.
- RIBEIRO, E. P. & SERAVALLI, E. A. G. Química de Alimentos. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgard Blucher Ltda, 1º ed, São Paulo, p. 155-157, 2004.
- RODRIGUES, A. A.. *Antimicrobial activity and production of enzymes with biotechnological interest of bacteria isolated from different habitats*. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Medicina) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia- GO, 2009.
- SALAR, R. K. *et al.* *Stress influenced increase in phenolic content and radical scavenging capacity of Rhodotorula glutinis CCY 20-2-26*. 3 Biotech, 2012, № 1, p. 53-60, 2013.
- SÁNCHEZ, C.. *Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi*. Biotechnology Advances, [s.l.], v. 27, n. 2, p.185-194, Elsevier BV, 2008.
- SHAMI, N. J. I. E. & MOREIRA, E. A. M.. *Licopeno como agente antioxidante*. Revista Nutrição, Campinas, vol. 17, nº2, p.227-236, abr./jun. 2004.
- SILVA, D. A.. *Maximização da produção de astaxantina por Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrohous) utilizando água de parboilização do arroz*. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2009
- SILVA, J. H. S.. *Isolamento e identificação de carotenoides de Rhodotorula mucilaginosa para aplicação cosmética*. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Repositório Institucional Pantheon, Rio de Janeiro, 2023.
- SILVA, S. R. S.. *Potencial biotecnológico da produção de pigmentos carotenóides por Rhodotorula spp. em soro de queijo coalho*. 120f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020.
- SINGLETON, V., ROSSI, J. A. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American Journal of Enology and Viticulture., 16, p. 144–158, 1965.
- STAMFORD, T. C.. *Produção e extração de pigmentos carotenoides por Rhodotorula minuta e Rhodotorula aurantiaca*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, 2015.
- SUCUPIRA, N. R. *et al.* *Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos*. UNOPAR Cient., Ciênc. biol. Saúde., 2012;14(4):263-269, Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos, CE, Brasil, out. 2012.

- TURNER, P., MAMO, G., KARLSSON, E., *Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining*. Microbio Cell Factories., 6, 1–23, 2007.
- UENOJO, M., PASTORE, G. M., *Pectinases: aplicações industriais e perspectivas*. Química Nova, v. 30, n. 2, p. 388–394, mar. 2007.
- VALDUGA, E. *et al* (2009). *Carotenoids production: microorganisms as source of natural dyes*. Química Nova, 32(9), 2429–2436, 2009.
- VALE, H. M. M., *et al*. *Yeasts in native fruits from Brazilian neotropical savannah: occurrence, diversity and enzymatic potential*. Biota Neotropica, v. 21, n. 4, e20201184, 2021.
- VILLELA, G. G.. *Pigmentos Animais: Zoocromos*. Editado pela Academia Brasileira de Ciências, p.5-31, 1976.
- WOUK, T. *et al*. *Caracterização bioquímica das poligalacturonases produzidas por Penicillium sp*. In: II congresso paranaense de microbiologia - simpósio sul-americano de microbiologia ambiental. Campinas, Galoá, 2016.
- YAN, L. *et al*. *Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants*. Applied Microbiology And Biotechnology, v. 103, n. 8, p.3327-3340, 7 mar. 2019.
- YARROW, D. *Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts*. In: Kurtzman CP and Fell JW (eds). The yeasts. A taxonomic study, 5th edition, Elsevier, Amsterdã, p. 77-99, 2011.